



Lange Kleiweg 137
Postbus 45
2280 AA Rijswijk

www.tno.nl

T +31 15 284 30 00
F +31 15 284 39 91
info-DenV@tno.nl

TNO-rapport

TNO-DV 2007 A297

**Bio-Aërosol Testkamer: Ontwikkeling van
protocollen**

Datum	20 juli 2007
Auteur(s)	ir. M.P. Broekhuijsen
Rubricering rapport	Ongerubriceerd
Vastgesteld door	dr. J. van der Plas
Vastgesteld d.d.	10 juli-2007
	(Deze rubricering wijzigt niet)
Titel	Ongerubriceerd
Samenvatting	Ongerubriceerd
Managementuittreksel	Ongerubriceerd
Rapporttekst	Ongerubriceerd
Exemplaarnummer	25
Oplage	31
Aantal pagina's	32 (excl. RDP & distributielijst)

Alle rechten voorbehouden. Niets uit dit rapport mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van TNO.

Indien dit rapport in opdracht van het ministerie van Defensie werd uitgebracht, wordt voor de rechten en verplichtingen van de opdrachtgever en opdrachtnemer verwezen naar de 'Modelvoorwaarden voor Onderzoeks- en Ontwikkelingsopdrachten' (MVDT 1997) tussen de minister van Defensie en TNO indien deze op de opdracht van toepassing zijn verklaard dan wel de betreffende ter zake tussen partijen gesloten overeenkomst.

© 2007 TNO

20071113028

AQ F08-02-01316

DISTRIBUTION STATEMENT A
Approved for Public Release
Distribution Unlimited

Bio-Aërosol Testkamer: Ontwikkeling van protocollen

De Bio-Aërosol Testkamer is een unieke faciliteit van 12 m³ waarin een gecontroleerde bio-aërosol kan worden gegenereerd. Aërosolen van bio-simulanten van 5 - 100 ACPLA zijn gegenereerd. De testkamer is daarmee geschikt voor het testen van bio-detectoren.



Probleemstelling

Bij TNO Defensie en Veiligheid, locatie Rijswijk is eind 2005 een testfaciliteit beschikbaar gekomen voor het testen van bio-detectoren met een gecontroleerde bio-aërosol. Gezien de complexiteit van de faciliteit in het bijzonder en bio-aërosolen in het algemeen was het noodzakelijk kennis en ervaring op te bouwen omtrent het gebruik van deze faciliteit. Binnen programma V502, WP3, onderdeel

Puntdetectie B was budget beschikbaar gesteld speciaal voor dit doel.

Beschrijving van de werkzaamheden

In 2006 is gewerkt aan het leren omgaan met de Bio-Aërosol Testkamer (BAT-kamer) in algemene zin. Er is met drie verschillende simulanten van biologische strijdmiddelen geëxperimenteerd, met als doel ervaring op te doen in het gebruik

ervan (elk simulant vraagt een eigen aanpak). Tevens is een aanvang gemaakt met het leren koppelen van externe, te testen apparatuur, en het opstellen van standaard protocollen voor de drie bio-simulanten.

Resultaten en conclusies

In 2006 hebben twee operators voldoende basiservaring met de BAT-kamer opgedaan. Met de drie simulanten (sporen van *Bacillus subtilis*, cellen van *Erwinia herbicola*, en het virus MS2) zijn goede resultaten bereikt. Met deze drie simulanten kan in het concentratiebereik van 5-100 ACPLA (agent containing particles per litre of air) een stabiele aërosol worden gegenereerd. Dit is vereist voor het testen van bio-detectoren. Een extern apparaat is aangekoppeld, na enkele kleine aanpassingen aan de BAT-kamer. Voorlopige, werkbare protocollen voor de drie simulanten zijn opgesteld.

Toepasbaarheid

In principe kan een willekeurige bio-detector met de drie simulanten getest worden volgens gangbare internationale eisen. De protocollen hiervoor zullen in de komende jaren nog geoptimaliseerd worden. Voor ovalbumine (het simulant voor eiwit-toxines) moet nog een methode worden opgezet.

Contact en rapportinformatie

PROGRAMMA

Programmabegeleider
KTZAR M.J.W. Neuteboom,
Mindef / HDP / DMG

Programmaleider
dr. R.W. Busker,
TNO Defensie en Veiligheid

Programmatitel
Passieve verdediging tegen NBC en
radiologische wapens

Programmanummer
V502

Programmaplanning
Start 1 januari 2006
Gereed 31 december 2009

Frequentie van overleg
Met de projectbegeleider werd
eenmaal per kwartaal gesproken
over de invulling en de voortgang
van het onderzoek.

PROJECT

Projectbegeleider
dr. J. van der Plas,
Mindef / CDC / BG GZ / CEMG

Projectleider
dr. F.J. Bikker,
TNO Defensie en Veiligheid

Projecttitel
Puntdetectie B en testmethodiek

Projectnummer
014.17750

Projectplanning
Start 1 januari 2006
Gereed 31 december 2009

Projectteam
ir. M.P. Broekhuijsen,
D. van de Meent,
A.L. van der Laaken

Lange Kleiweg 137
Postbus 45
2280 AA Rijswijk

T +31 15 284 30 00
F +31 15 284 39 91

info-DenV@tno.nl

TNO-rapportnummer
TNO-DV 2007 A297

Opdrachtnummer
-

Datum
juli 2007

Auteur(s)
ir. M.P. Broekhuijsen

Rubricering rapport
Ongerubriceerd

Samenvatting

In december 2005 werd de Bio-Aërosol Testkamer (BAT-kamer) geplaatst door de firma Dycor Technologies Ltd., Canada. In de BAT-kamer kan een bio-aërosol gegenereerd worden onder gecontroleerde omstandigheden. De BAT-kamer is in principe alleen geschikt voor simulanten van biologische strijdmiddelen (niet-pathogenen). De voornaamste toepassing van de BAT-kamer is het testen van airsamplers en biodetectoren, maar andere toepassingen zijn eveneens denkbaar (bijvoorbeeld decontaminatie, agent fate). In 2006 is gewerkt aan:

- Validatie van de BAT-kamer op grond van de specificaties.
- Leren werken met de BAT-kamer.
- Reproduceerbaar genereren van bio-aërosolen van drie simulanten (*Bacillus globigii* sporen, *Erwinia herbicola* en MS2 virus).

In feite zijn de eerste twee punten uitgevoerd door een reeks experimenten met de simulanten uit te voeren (derde punt). Daarmee is in 2006 validatie van de BAT-kamer positief afgerond. Punt 2 (Leren werken met de BAT-kamer) is nagenoeg afgerond, maar hier kan gesteld worden dat het 'leerproces' nog jaren door zal gaan, rekening houdend met de complexiteit van de BAT-kamer zelf en bio-aërosolen in het algemeen.

De beste ervaring is opgedaan met *B. globigii* (BG-sporen). Met dit simulant kan reproduceerbaar een bio-aërosol gegenereerd worden tussen 5 en 100 ACPLA. Een concentratie tot enkele honderden ACPLA kan waarschijnlijk wel gehaald worden, maar kan niet betrouwbaar gemeten worden met de referentie-apparatuur (STA-samplers). Een aërosol van BG kan minimaal 6 uur lang stabiel worden gehouden. Met *E. herbicola* (EH) zijn stabiliteitsproblemen opgetreden. Deze zijn verholpen door gebruik van een ander type vernevelaar en het verdunnen van de cel-suspensie met gebruikt kweekmedium i.p.v. vers kweekmedium. Voor MS2 virus moest een alternatieve methode worden gevonden voor de STA-samplers, door gebruik te maken van een zogenaamde top-agar. Dit is redelijk snel opgelost en blijkt goed te werken. Met EH en MS2 kan eveneens een aërosol tussen 5 en 100 ACPLA reproduceerbaar worden gegenereerd.

Extra ervaring werd opgedaan door een UV Aërosol Particle Sizer (UV-APS) aan te sluiten op de BAT-kamer, samen met een Impactor die in de BAT-kamer werd geplaatst. De Impactor fungeerde hierbij als een deeltjes-concentrator, zodat een geconcentreerde bio-aërosol door de APS gemeten kon worden. Desondanks was de concentratie te gering om duidelijke meetresultaten met de APS te verkrijgen. Het voornaamste resultaat van deze experimenten was het leren werken met andere, externe apparatuur, als oefening voor het testen van biodetectoren. Tijdens het meten van externe apparatuur komen veel onverwachte zaken naar voren, zoals bijvoorbeeld een luchtdichte aansluiting op de BAT-kamer om een correcte meting te kunnen doen.

Summary

The Bio Aerosol Test (BAT) chamber was installed in December 2005 by the company Dycor Technologies Ltd., Canada. In the BAT chamber, bio aerosols can be generated under controlled conditions. In principle, use of the BAT chamber is limited to simulants of biological warfare agents (non-pathogens). The main application of the BAT chamber is testing of airsamplers and biodetectors, but other applications are also feasible (e.g. decontamination, agent fate). In 2006, work has been performed aimed at:

- Validation of the BAT chamber according to the specifications.
- Building user experience.
- Reproducible generation of aerosols of three simulants (*Bacillus globigii* spores, *Erwinia herbicola*, and MS2 virus).

The first two items have been addressed by performing many experiments with simulants (item 3). This resulted in a positive conclusion for item 1. Item 2 (user experience) has been adequately addressed, although this will be an ongoing item over many years, considering the complexity of the BAT chamber itself, and bio aerosols in general.

Most experience has been accomplished with *B. globigii* (BG spores). A reproducible aerosol between 5 and 100 ACPLA can be generated with this simulant.

A concentration up to several hundreds of ACPLA can probably be achieved, but this cannot accurately be measured with the reference equipment (STA samplers).

An aerosol of BG spores can be stably maintained for up to 6 hours. Stability issues were encountered with *E. herbicola* (EH). These were solved by using a different type of nebulizer and using spent medium for dilution of cells. An alternative method of using the STA samplers had to be found for MS2 virus, by using a so-called top-agar. This was solved quickly and adequately. With EH and MS2, a reproducible aerosol between 5 and 100 ACPLA can be generated as well.

Additional experience was achieved by connecting a UV Aerosol Particle Sizer (UV-APS) to the BAT chamber, together with an Impactor which was placed inside the BAT chamber. The Impactor functioned as a particle concentrator, delivering a concentrated bio-aerosol to the APS. Still, the concentration was too low to obtain meaningful results with the APS. The main result of these tests was gaining experience with connecting external devices, as a practice for testing bio-detector equipment. When evaluating external devices, unexpected challenges often arise, including creating an airtight connection with the BAT chamber, which is essential for proper measurements.

Inhoudsopgave

	Managementuittreksel.....	2
	Samenvatting.....	4
	Summary	5
	Afkortingen	7
1	De Bio-Aërosol Testkamer	8
1.1	Aanleiding en realisatie.....	8
1.2	Beschrijving van de BAT-kamer.....	9
1.3	Berekening ACPLA	17
1.4	Veiligheidsaspecten	21
1.5	Simulant biologische agentia	21
1.6	Doel	22
2	Verkregen resultaten in 2006	23
2.1	Bediening en validatie van de BAT-kamer.....	23
2.2	BG	23
2.3	EH	25
2.4	MS2	27
2.5	Randapparatuur.....	28
3	Discussie en vervolg	29
4	Referenties en websites	31
5	Ondertekening	32

Afkortingen

ACPLA	Agent Containing Particles per Liter of Air
APS	Aërosol Particle Sizer
ATCC	American Type Culture Collection
BAT-kamer	Bio-Aërosol Testkamer
BG	<i>Bacillus globigii</i> (meestal in de vorm van sporen)
BHI	Brain Heart Infusion
CFM	Cubic Feet per Minute
CFU	Colony Forming Units
EH	<i>Erwinia herbicola</i>
HEPA filter	High Efficiency Particulate Air filter
MS2	Male Specific 2, naam van een bekend virus van de <i>Escherichia coli</i> bacterie
OV	Ovalbumine
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFU	Plaque Forming Units
rpm	ronden per minuut
SD	Standaard Deviatie
STA	Slit-To-Agar
TSA	Trypsin Soy Agar

1 De Bio-Aërosol Testkamer

1.1 Aanleiding en realisatie

Biodetectie (detectie van biologische agentia) is een zeer actueel onderwerp. In vergelijking met C-detectie (detectie van chemische agentia), loopt biodetectie achter, zowel in technische als operationele zin. Het betrouwbaar detecteren van biologische agentia is moeilijker dan van chemische agentia en biodetectoren zijn (nog) nauwelijks commercieel verkrijgbaar. De markt voor biodetectie is echter flink in beweging en veel bedrijven en instellingen werken aan ontwikkeling van methoden en apparatuur.

TNO Defensie en Veiligheid, locatie Rijswijk, beschikt al vele jaren over een test-opstelling voor C-detectoren. Hierin kan een gereguleerde concentratie van chemische strijdmiddelen onder gecontroleerde omstandigheden worden gegenereerd en aangeboden aan een te testen detector. Deze opstelling is al meerdere jaren veelvuldig in gebruik voor opdrachten vanuit industrie en overheid.

Naar analogie van de test-opstelling voor C-detectoren ontstond er behoefte aan een testfaciliteit voor biodetectoren, mede op basis van de te verwachten groei van test-aanvragen voor biodetectoren. Al in 2001 / 2002 werd betoogd dat een faciliteit voor biodetectie gewenst was (Broekhuijsen et al., 2002). Daarbij was het van meet af aan duidelijk dat het moest gaan om een testopstelling waarmee bio-aërosolen konden worden gegenereerd. Met name alarmerings-biodetectoren zijn vooral gericht op detectie van een biologisch agens in de lucht.

Na het beschikbaar komen van budget werd onderzoek verricht naar de potentiële markt voor het testen van biodetectoren en naar een geschikte op te bouwen faciliteit (Kievit et al., 2004). In het kader van dit onderzoek werden ook bezoeken afgelegd naar faciliteiten elders, o.a. bij de Canadese Defensie Research (DRDC in Suffield) en bij de Duitse Defensie Research (WIS in Munster).

Verschillende opties werden in het voortraject overwogen, met name twee hoofdopties:

- 1 Een kamer met beperkte klimaatregeling van 50 m³ die een zelfstandig 'gebouw' vormt met een sluis-ingang.
- 2 Een kamer van 12 m³ die als unit in een bestaande ruimte past.

In beide gevallen bleek de firma Dycor Technologies Ltd in Canada (<http://www.dycor.com>) de beste leverancier te zijn, en voor beide opties werd offerte gevraagd aan Dycor.

Optie 1 zou bepaalde voordelen en extra mogelijkheden bieden, maar zou een veel grotere investering vereisen. Optie 2 was budgettair haalbaar en bood voldoende mogelijkheden om een rol te spelen in de biodetectiemarkt. Een belangrijke overweging was het feit dat de capaciteit van de 12 m³ kamer voldoende is ten opzichte van de capaciteit van de gangbare detectoren en airsamplers (de hoeveelheid lucht die door een detector of airsampler wordt weggezogen uit de kamer zal de aërosol in de kamer niet significant beïnvloeden). Een ander voordeel van optie 2 was het feit dat de 12 m³ kamer een min of meer standaard product vormt. Vrijwel dezelfde kamer (met dezelfde

voornaamste specificaties) is bij de firma Dycor zelf in gebruik, en is door Dycor geleverd aan verschillende andere organisaties, waaronder de Duitse Defensie research (WIS) in Munster. Hierdoor zou gemakkelijker samenwerking kunnen ontstaan en uitwisseling van data kunnen plaatsvinden.

In december 2005 werd door de firma Dycor een Bio-Aërosol Testkamer (BAT-kamer) van 12 m³ geplaatst. De BAT-kamer werd geplaatst in een daarvoor geschikte, ongebruikte zaal van een bijgebouw van de locatie Rijswijk, waarvoor enige aanpassingen van beperkte aard noodzakelijk waren (Wolterink et al., 2006).

1.2 Beschrijving van de BAT-kamer

1.2.1 Algemeen

De BAT-kamer (figuur 1) is een roestvrij stalen constructie die in onderdelen is aangevoerd en ter plaatse is opgebouwd door Dycor. De afmetingen zijn 2 m breed, 2 m hoog en 3 m lang. De eigenlijke kamer is gebouwd op een stellage van 2 m hoog, zodat de onderzijde goed bereikbaar is. Aan de onderzijde zijn diverse aansluitingen voor externe meetapparatuur en te testen apparaten.



Figuur 1 De BAT-kamer van TNO Defensie en Veiligheid, locatie Rijswijk.

Een aantal gegevens van de BAT-kamer is samengevat in tabel 1. Verschillende begrippen en de details worden in de verdere tekst uitgewerkt.

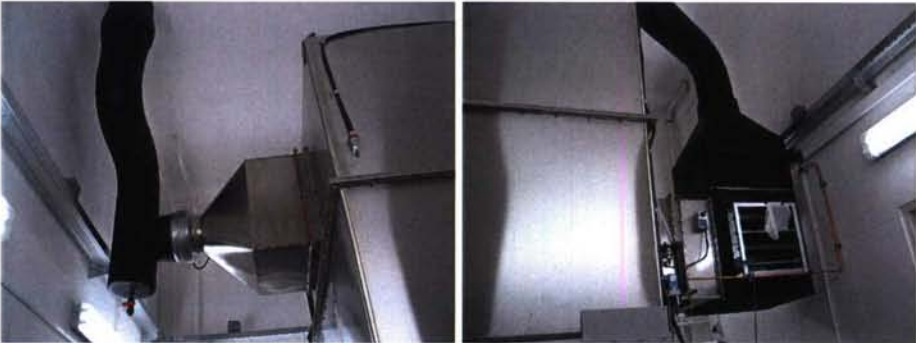
Tabel 1 De belangrijkste gegevens van de BAT-kamer.

Eigenschap	Omschrijving
Materiaal wanden	RVS ('14-gauge stainless steel')
Afmeting	3 m lang, 2 m breed, 2 m hoog
Inhoud	12 m ³
Maximum luchtverplaatsing	11750 L/min
HEPA filters	2 (inlaat en uitlaat) met voorfilters
Toegangen	1 deur (70 × 70 cm) met raam en 2 handschoenen; 1 extra raam en handschoen; 1 luchtsluis; 7 connectie-poorten
Maximum aantal vernevelaars	2, onafhankelijk aan te sturen
Bio-aërosol concentratie-bereik	Minimaal 10 - 100 ACPLA
Randapparatuur	Grimm 1.108; New Brunswick Scientific STA-203 sampler (2 st.); PC
Meters	Relatieve vochtigheid (nauwkeurigheid +/- 5%); Temperatuur (nauwkeurigheid +/- 2 °C); Luchtdruk
Luchtdruk	50 - 150 Pa onderdruk in de kamer d.m.v. ventilator bij uitlaat

1.2.2 Luchtstroming

De luchtstroom door de BAT-kamer is regelbaar, met een maximum luchtstroom van 415 CFM (Cubic Feet per Minute). Omgerekend naar metrische waarden is dat ongeveer 705 m³/uur of 11750 L/min. Dat betekent een verversing van de totale inhoud van de BAT-kamer ongeveer eens per minuut. In de praktijk wordt de kamer meestal op 30% van de maximumcapaciteit gebruikt, dat wil zeggen met een luchtstroom van ca. 3500 L/min en een verversing van de inhoud van eens per 3.5 minuut.

Zowel de instromende als de uitstromende lucht passeert een High Efficiency Particulate Air (HEPA) filter (figuur 2), zodat biologische agentia vanuit de omgeving geweerd worden en biologische agentia die in de BAT-kamer gegenereerd worden, niet in het milieu terechtkomen.



Figuur 2 Links: De uitstroomopening. Rechts: De instroomopening. In beide units bevindt zich een HEPA filter.

De instromende lucht komt niet rechtstreeks van de buitenlucht, maar vanuit een zolderruimte boven de ruimte waar de BAT-kamer staat. Hierdoor is er sprake van een bufferend effect op eventuele extreme temperaturen. De instromende lucht kan bovendien binnen bepaalde grenzen gereguleerd worden. Een werkt temperatuur van 20 °C is gedurende het hele jaar haalbaar. Bij gemiddelde buitentemperatuur kan de kamertemperatuur gevarieerd worden van ca. 15 °C tot ca. 30 °C. Of deze waarden

onder meer extreme buitentemperaturen ook gehaald kunnen worden is nog niet vastgesteld. De relatieve luchtvochtigheid kan vanaf de omgevingswaarde omhoog tot 90% worden geregeld. De instromende lucht kan geen lagere luchtvochtigheid krijgen dan de omgevingswaarde. De luchtdruk kan niet gereguleerd worden, maar is ca. 50 Pa tot maximaal 150 Pa lager dan de omgevingswaarde, wegens de zuigende werking van de uitstroomventilator. De temperatuur, relatieve vochtigheid en relatieve onderdruk in de kamer worden continue gemeten en in een log-file opgeslagen.

In de BAT-kamer bevinden zich twee ventilatoren (figuur 3) in twee tegenovergestelde hoeken van de kamer die zorgen voor menging van de lucht zodat een homogene aerosol verkregen wordt.



Figuur 3 De binnenzijde van de BAT-kamer met één van de twee ventilatoren voor het homogeniseren van de aerosol. De koperen buis in de bodem is de aansluiting op één van de twee slit-to-agar samplers aan de onderzijde. Achterin de BAT-kamer liggen twee platen met agar-voedingsbodems ten behoeve van depositie-metingen.

1.2.3 *Regeling en meting van aerosolen*

De aerosol in de BAT-kamer wordt gereguleerd middels meetinstrumenten en software. Het belangrijkste fysieke onderdeel hierin is de particle sizer model 1.108 (figuur 4) van Grimm Technologies (<http://www.dustmonitor.com/Occupational/1108.htm>). Deze bevindt zich aan de onderzijde van de BAT-kamer (figuur 5). De Grimm 1.108 meet door middel van laser-scattering deeltjes in de lucht van 0.3 μm tot 20 μm , verdeeld over 15 kanalen. De Grimm 1.108 is continue verbonden met de inhoud van de BAT-kamer, gebruikt 1.2 L/min van de lucht in de BAT-kamer en meet elke 6 seconden (120 mL) het aantal deeltjes.

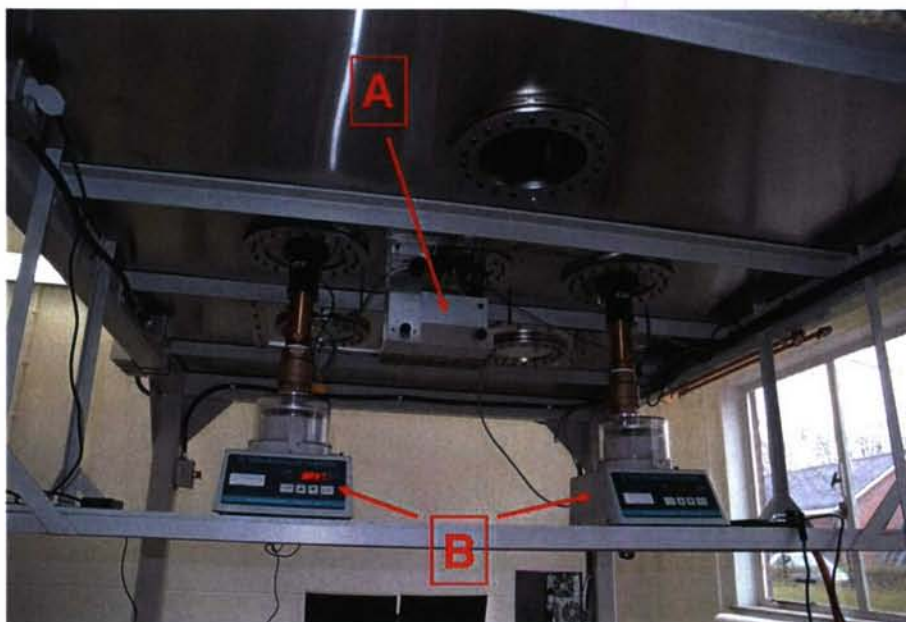


Figuur 4 De Grimm 1.108 particle sizer.

Tijdens een experiment wordt een waarde ingesteld voor de Grimm 1.108, en een terugkoppelings-mechanisme naar de vernevelaar zorgt ervoor dat de aerosol-concentratie op peil wordt gehouden. De BAT-kamer heeft hiervoor een zogenaamd PID (Proportional, Integrated, Derivative) controle systeem.

De Grimm 1.108 meet deeltjes ongeacht of er sprake is van levende organismen of alleen maar zout- of stofdeeltjes. Aangezien de meest gebruikte biologische aerosol concentratie (10 - 100 ACPLA) te laag is voor de gevoeligheid van de Grimm 1.108, wordt gebruik gemaakt van andere, niet-levende deeltjes, bijvoorbeeld SiO_2 (silica) deeltjes, in een vaste verhouding tot de biologische deeltjes. Er is hierbij sprake van een aerosolmengsel, waarbij er geen noodzakelijke interactie plaatsvindt tussen de silica en de biologische deeltjes (de biologische deeltjes zijn bijvoorbeeld niet afhankelijk van de silicadeeltjes als drager). Door de silica aerosol concentratie stabiel te houden, is de biologische concentratie in principe ook stabiel.

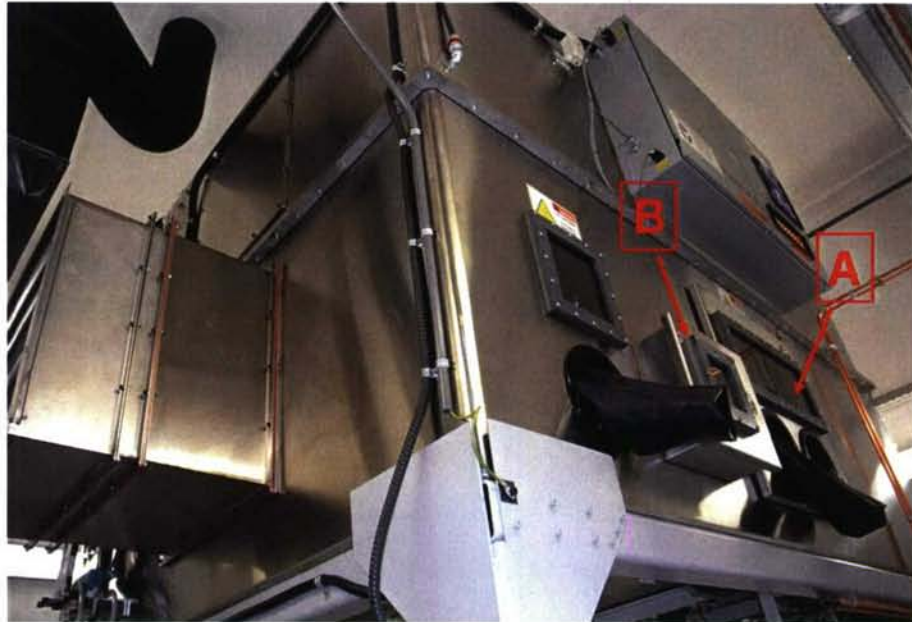
Om zeker te weten wat de concentratie aan biologische deeltjes in de aerosol is, wordt een referentiemeting gedaan. Hiervoor zijn twee zogenaamde slit-to-agar (STA) samplers aangesloten (Figuur 5). De gebruikte STA samplers zijn van New Brunswick Scientific BV (<http://www.nbsc.com/airsamp.aspx>). Op gewenste tijden worden deze STA samplers aangezet om een referentiemeting te verrichten waaruit de aerosol-concentratie uitgedrukt in ACPLA kan worden berekend (zie onder).



Figuur 5 De onderzijde van de BAT-kamer met de Grimm optical particle sizer (A) en de twee slit-to-agar samplers (B).

1.2.4 Bediening

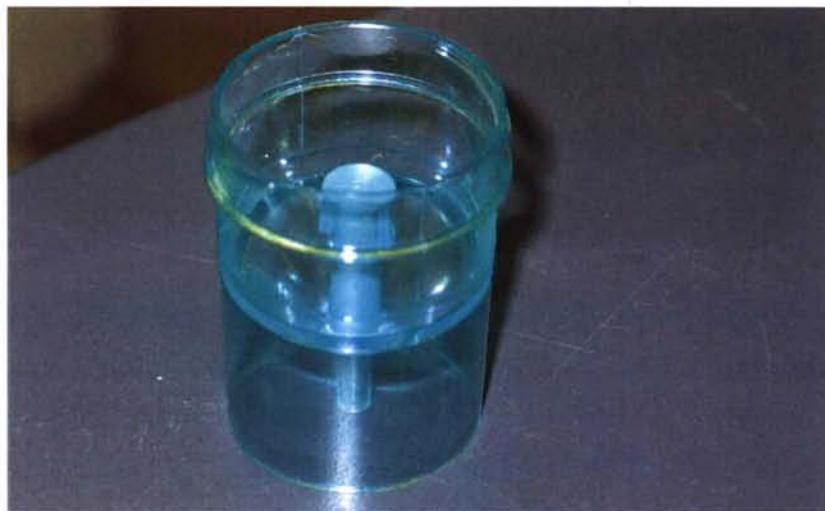
De bediening van de BAT-kamer geschiedt door middel van speciale ('dedicated') software, genaamd ATC (Aërosol Test Chamber) en gebaseerd op Labview. Figuur 6 laat een schema zien uit de handleiding van de leverancier waarin alle verbindingen te zien zijn. De user-interface van de ATC software is te zien in figuur 7. Er wordt gebruik gemaakt van twee monitoren, waarbij op de linker monitor een regelpaneel met virtuele knoppen en meters te zien is (de user-interface, figuur 7), en op de rechtermonitor verschillende metingen en grafieken te zien zijn, o.a. een uitlezing van de Grimm 1.108. Met de virtuele knoppen op het regelpaneel zijn met een muisklik allerlei parameters en componenten aan te sturen, waaronder ook eenvoudige zaken zoals de verlichting binnenin de BAT-kamer, de waarschuwinglamp, de ventilatoren, en dergelijke.



Figuur 8 De achterzijde van de BAT-kamer met de toegangsdeur met raam en doorvoerhandschoenen (A) en de luchtsluis (B). Links van de luchtsluis is nog een raam en doorvoerhandschoen.

1.2.5 Verneveling

Om een bio-aërosol te genereren wordt een vernevelaar gevuld met een suspensie van een bio-agens. De meest gebruikte vernevelaar is de Hudson vernevelaar (figuur 9), een commercieel verkrijgbare, disposable vernevelaar uit de klinische markt. In de Hudson vernevelaar past een suspensie van ruim 80 mL. Door middel van een slang wordt stikstof ingeblazen waardoor de suspensie door een nauwe opening wordt geperst. De stikstoftoevoer wordt gereguleerd door de Grimm 1.108 (zie boven). De vernevelaar wordt via de luchtsluis in de BAT-kamer geplaatst (figuur 10) en middels de doorvoerhandschoenen (figuur 11) vastgemaakt aan een statief in de kamer (figuur 12).



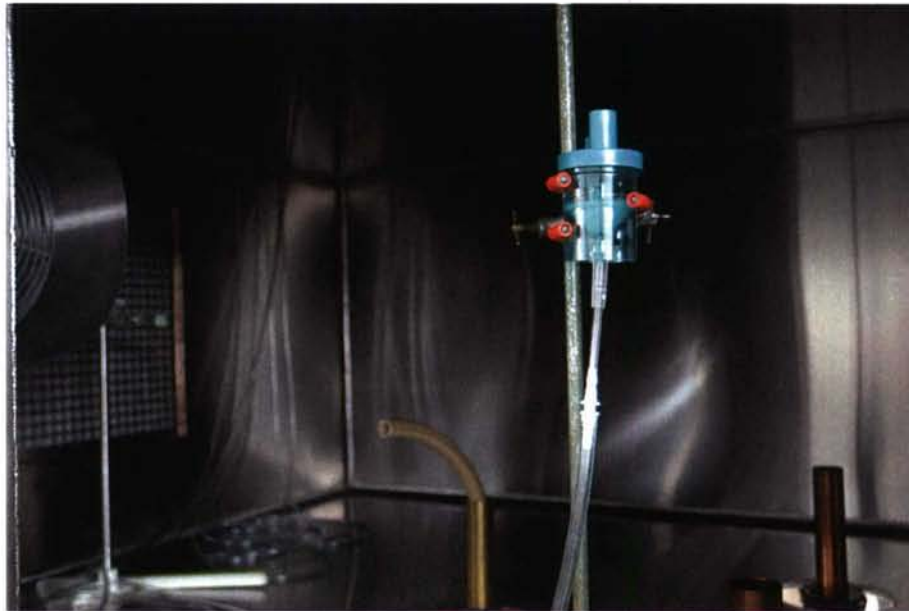
Figuur 9 Een Hudson vernevelaar, type Up-draft® nebulizer (catno. 1710). De bio-aërosol wordt gegenereerd door het inspuiten van stikstof in de vernevelaar waardoor de suspensie met biodeeltjes in het vaatje door een nauwe opening wordt geperst.



Figuur 10 De gevulde vernevelaar wordt via de luchtsluis in de BAT-kamer geplaatst.



Figuur 11 De gevulde vernevelaar wordt door middel van de luchtdichte doorvoerhandschoenen binnen de BAT-kamer gepositioneerd en aangesloten.



Figuur 12 De vernevelaar is in een statief bevestigd binnen in de BAT-kamer, en verbonden met een slang voor de stikstoftoevoer. Geheel links is één van de twee fans te zien waarmee de aerosol homogeen wordt verdeeld over de kamer.

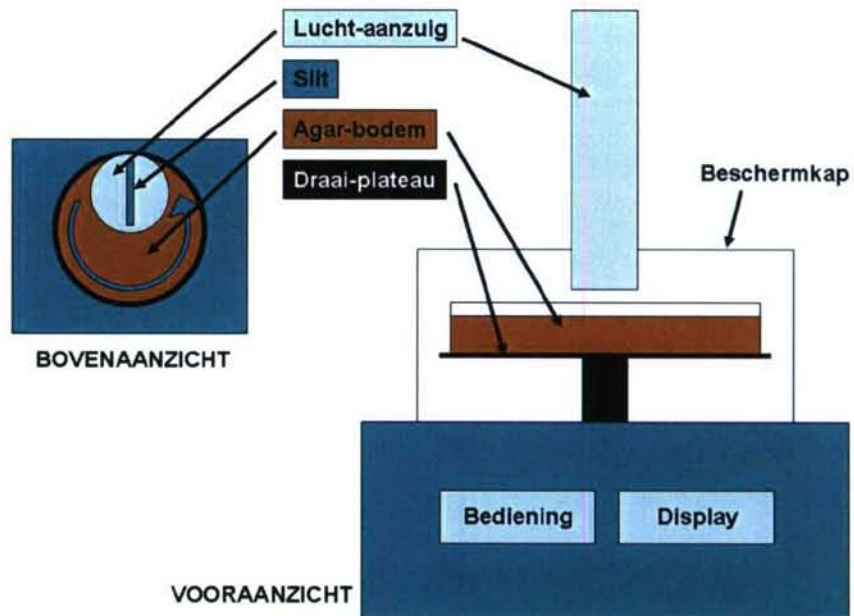
1.3 Berekening ACPLA

Alhoewel de aerosol tijdens een experiment gecontroleerd en stabiel wordt gehouden door de Grimm 1.108 (zie boven), geeft dat geen informatie over de concentratie van levende deeltjes. In feite is het begrip 'levende deeltjes' geen geschikte term. Een betere term is 'deeltjes waarop zich één of meer levende organismen bevinden'. Levende cellen of sporen, of virusdeeltjes (virussen zijn strikt genomen niet levend) kunnen als afzonderlijke eenheden in een aerosol voorkomen, maar vaker zijn meerdere eenheden samengeklonterd, al of niet in samenhang met een stof- of vochtdeeltje. Het aantal 'bio-eenheden' per aerosoldeeltje is zeer moeilijk te meten.

Daarom is een speciale term bedacht voor het uitdrukken van de concentratie van bio-aerosolen: Agent Containing Particles per Liter of Air (ACPLA). Het gaat hier om deeltjes waarin of waarop zich één of meer levende organismen (of virusdeeltjes) bevinden. Dit kan een deeltje zijn dat uitsluitend bestaat uit één cel, spore of virusdeeltje, of één groter stofdeeltje of waterdruppel met enkele tot tientallen organismen of meer, erop of erin. Een optical sizer zoals de Grimm 1.108 kan geen onderscheid maken tussen deeltjes met of zonder levende organismen erop, en hiermee kan dus geen concentratie in ACPLA worden berekend. Daarvoor is een Slit-to-Agar (STA) sampler nodig.

Een STA-sampler (Figuur 13) werkt als volgt: Vanuit de te bemonsteren ruimte wordt lucht aangezogen met een bekende en in te stellen waarde (bijvoorbeeld 30 L/min), aangedreven door een achter de STA-sampler aangesloten vacuumpomp. De lucht passeert eerst een smalle spleet (de 'slit'), die zich vlak boven een agar-voedingsbodem bevindt. De spleet loopt vanuit het centrum van de voedingsbodem radiaal naar de buitenrand. De deeltjes in de aangezogen lucht worden op de agar geblazen. Een bemonstering vindt plaats gedurende een bepaalde, in te stellen tijd (bijvoorbeeld 2 min). Tijdens de bemonstering draait het plateau waarop de

voedingsbodem zich bevindt een volle ronde (360 graden). Daarna wordt de luchtaanzuiging automatisch gestopt, en de plaat met voedingsbodem wordt eruit gehaald.



Figuur 13 Schematische tekening van een STA-sampler.

De platen met agar voedingsbodems worden overnacht geïncubeerd bij 37 °C. De volgende dag zijn kolonies gegroeid op plaatsen waar een bio-aërosol deeltje is neergekomen op de agar (Figuur 14). Door telling van het aantal kolonies kan de bio-aërosol concentratie uitgedrukt in ACPLA worden uitgerekend.

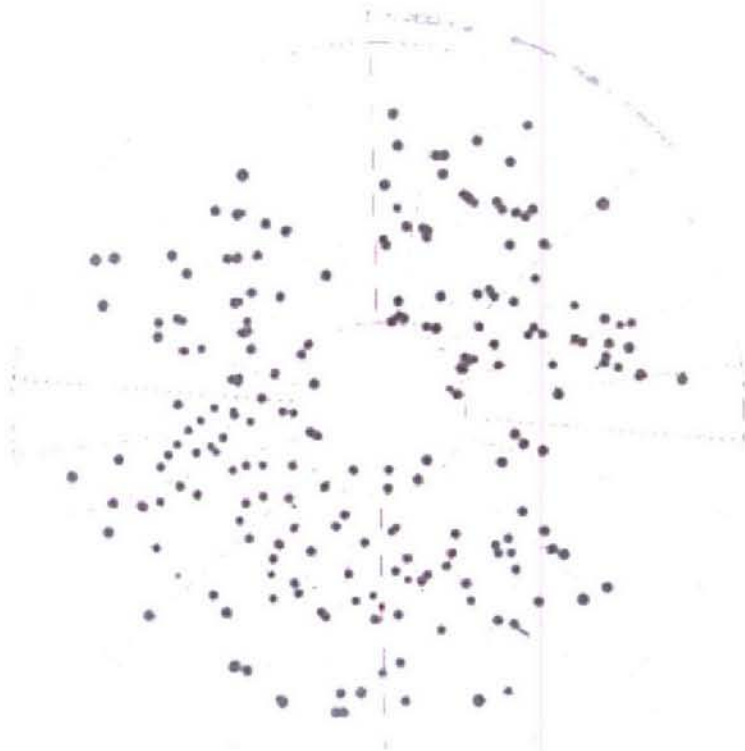


Figuur 14 Een foto van een plaat met agar-voedingsbodem na bemonstering in een STA-sampler en overnacht incubatie bij 37 °C. Er zijn honderden kolonies te zien. Aan de rechterzijde (op 'drie uur') is een zogenaamd 'sleutelgat' patroon te zien waar geen kolonies zijn. Dit wordt veroorzaakt doordat de slit zich niet boven de middelste, centrale cirkel bevindt en doordat de slit niet een volle 360 graden is rond gedraaid.

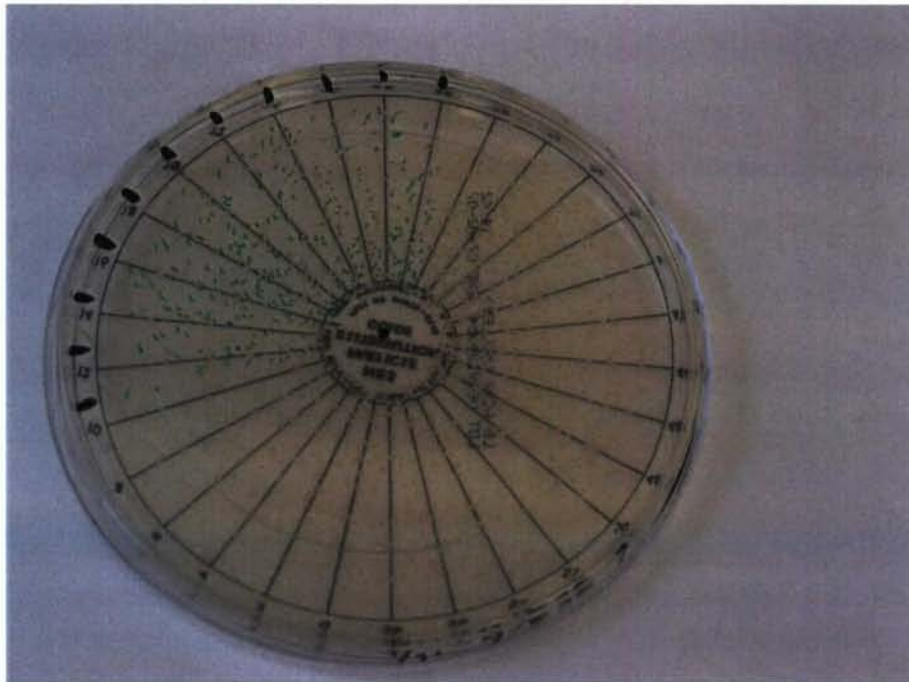
De bepaling van de concentratie uitgedrukt in ACPLA met een STA-sampler gaat als volgt: Het aantal kolonies op de plaat wordt geteld, bijvoorbeeld 450. Indien er met 30 L/min is bemonsterd gedurende 2 minuten, dan is er 60 L lucht gepasseerd. Dat betekent dat de concentratie $450/60 = 7.5$ ACPLA is.

Vaak wordt een transparant velletje met radiale sectoren over de plaat gelegd (figuur 15). Meestal is er sprake van 30 sectoren. Hierdoor kan de totale bemonsteringstijd van bijvoorbeeld 2 min worden onderverdeeld in 30 sectoren van 4 seconden elk. Door de sectoren afzonderlijk te tellen is het mogelijk een eventueel verloop van de bio-aërosol concentratie te zien gedurende de bemonsteringstijd.

In de praktijk van de BAT-kamer vindt dat evenwel zelden plaats, en zeker niet gedurende slechts 2 minuten. Bij handmatig tellen en veel kolonies is de sectorverdeling echter wel handig, omdat met het tellen van bijvoorbeeld 10 sectoren volstaan kan worden (figuur 16). De uitkomst hiervan wordt dan eenvoudig met 3 vermenigvuldigd. Dit is uiteraard alleen betrouwbaar indien er geen verloop te zien is binnen de totale bemonsteringstijd.



Figuur 15 Een schematische weergave van een gefotografeerde agar-voedingsbodem uit een STA-sampler. De stippen zijn de kolonies. De totale bemonsteringstijd (360 graden rond) is onderverdeeld in 30 sectoren.



Figuur 16 Een plaat met agar voedingsbodem met daarop het transparante vel met sector-verdeling. Kolonies zijn handmatig geteld binnen 10 sectoren (groene stippen).

1.4 Veiligheidsaspecten

De BAT-kamer is in principe volledig 'contained', en daardoor inherent veilig.

De volgende punten illustreren dit:

- De ruimte waarin de aerosol gegenereerd wordt is volledig afgesloten door een luchtdicht stalen omhulsel, behalve de in- en uitstroomopeningen.
- De in- en uitstroomopeningen zijn beiden voorzien van een HEPA filter, dat alle biologische agentia efficiënt afvangt.
- Er heerst een onderdruk van ca. 50 Pa in de aerosol ruimte, vergelijkbaar met de eisen voor een biocontainment laboratoriumruimte (BSL3).
- De externe aansluitpunten voor testapparatuur zijn afsluitbaar.
- De aerosol ruimte kan met behulp van UV-lampen worden gedesinfecteerd. Het effect van UV straling wordt wel gelimiteerd in zogenaamde schaduwplekken, bijvoorbeeld achter of onder de interne ventilatoren.
- De werkwijzen en procedures zijn afgestemd op veilig werken.

Desalniettemin wordt de BAT-kamer uitsluitend gebruikt voor zogenaamde (bio)simulanten (zie onder). Dit zijn micro-organismen die niet pathogeen zijn en een model vormen voor de werkelijke biologische strijdmiddelen. Voor zover bekend wordt dit type aerosol kamer ook door anderen in de wereld uitsluitend met simulanten gebruikt. Door alleen simulanten te gebruiken is geen speciale vergunning vereist.

Gebruik van (mild) pathogene organismen in de BAT-kamer zou in Nederland eerst in overleg met de betrokken autoriteiten moeten worden besproken. Hier bestaat in Nederland nog geen adequate regelgeving voor. Bestaande regelgeving voor werk met pathogenen stelt dat aerosolvorming zo mogelijk dient te worden vermeden, en dat handelingen waarbij aerosolvorming optreedt (bijvoorbeeld centrifugeren of vortexen) in luchtdicht afgesloten buizen of vaten dient te worden uitgevoerd, en het vervolgens openen van deze buizen of vaten in een klasse 2 biohazard kabinet dient te gebeuren. De vraag is of de BAT-kamer als net zo veilig gezien kan worden als een klasse 2 biohazard kabinet.

1.5 Simulant biologische agentia

De gebruikte simulanten zijn min of meer een internationale standaard. Ze worden gebruikt door een aantal NATO landen in hun Defensie programma, en zelfs in levende vorm gebruikt voor veldtesten, waarbij de simulanten in de open lucht worden verspreid.

De vier standaard simulanten zijn:

- 1 Sporen van de bacterie *Bacillus globigii* (BG). Dit simulant vormt een model voor sporen van de Anthrax bacterie *Bacillus anthracis*. BG wordt algemeen beschouwd als ongevaarlijk voor mens, dier en milieu. BG staat tegenwoordig officieel in de boeken als *Bacillus atrophaeus*.
- 2 Cellen van de bacterie *Erwinia herbicola* (EH). Dit simulant vormt een model voor Gram-negatieve bacteriën, waaronder *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis* en *Brucella*. EH wordt algemeen beschouwd als ongevaarlijk voor mens, dier en milieu, alhoewel het ook bekend staat als plantpathogeen. EH staat tegenwoordig officieel in de boeken als *Pantoea agglomerans* (ATCC 33243).
- 3 Deeltjes van het virus MS2. Dit virus is in staat tot infectie van de bacterie *Escherichia coli*, en wordt daarom meestal geclassificeerd als een bacteriofaag

(letterlijk: bacterie-eter). MS staat voor 'male specific' en refereert aan het fenomeen in de bacterie *E. coli* waarbij sommige cellen (aangeduid met 'male') beschikken over uitsteeksels (zogenaamde pili) die het aanhechtingspunt van MS2 vormen en voorwaarde zijn voor infectie. Uiteraard zijn deze pili van nature ergens anders voor bestemd dan voor virusinfectie.

- 4 Ovalbumine (OV). Ovalbumine is het voornaamste bestanddeel van het wit van een vogelei, en is daarmee de naamgever van het begrip 'eiwit'. OV staat model voor eiwit-toxines, waaronder ricine en botulinum-toxine. Aangezien OV niet levend is, wordt hier de aërosol-concentratie niet uitgedrukt in ACPLA maar in $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

De vier standaard simulanten zijn nog eens samengevat in tabel 2.

Tabel 2 De vier standaard bio-simulanten.

Simulant	Afkorting	Type agens	Vorm	Model voor	Alternatieve namen
<i>Bacillus globigii</i>	BG	Bacterie	Sporen	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis var niger</i> ; <i>Bacillus atrophaeus</i>
<i>Erwinia herbicola</i>	EH	Bacterie	Vegetatieve cellen	Gram-negatieve bacteriën	<i>Pantoea agglomerans</i>
MS2	MS2	Virus	Virusdeeltjes	Virussen	
Ovalbumine	OV	Eiwit	Eiwit	Eiwit-toxines	

1.6 Doel

Het doel in deze fase van het project kan geformuleerd worden als: Gereed te zijn voor een (externe) opdracht voor het testen van biodetectie-apparatuur.

Daarin kunnen drie hoofdpunten worden gedefinieerd:

- 1 De BAT-kamer dient gevalideerd te worden. Dit betekent dat aangetoond moet worden dat de BAT-kamer blijkt te voldoen aan de gestelde technische eisen.
- 2 Met alle vier simulanten moet reproduceerbaar een stabiele bio-aërosol kunnen worden gegenereerd binnen zeker bereik.
- 3 Er moet voldoende kennis en ervaring met de BAT-kamer worden opgebouwd om efficiënt met deze faciliteit te kunnen werken.

De technische (fysieke) specificaties van de BAT-kamer zijn goed bekend en duidelijk vastgelegd. De beoogde waarden en eisen aan gebruik zijn echter niet zo duidelijk geformuleerd. Wel kan een aantal zaken beschreven worden, waaronder de volgende:

- Met de BAT-kamer moet een 'statische' en een 'dynamische' wolk (aërosol) gegenereerd kunnen worden. Een statische wolk is een aërosol waarvan de concentratie (uitgedrukt in ACPLA) stabiel blijft gedurende een bepaalde tijd. Een dynamische wolk is een aërosol die tijdelijk aanwezig is, d.w.z. een piekconcentratie heeft gedurende korte tijd en daarvoor en daarna afwezig is. Biodetectoren kunnen in beide situaties getest worden.
- De vier standaard bio-simulanten moeten gebruikt kunnen worden in de BAT-kamer.
- Een concentratiebereik van 10 - 50 ACPLA is minimaal vereist voor BG, EH en MS2. De gewenste concentratie moet stabiel gehouden kunnen worden gedurende minimaal 1 uur.
- De BAT-kamer moet na een experiment weer snel, bij voorkeur binnen 30 minuten, te gebruiken zijn voor een volgend experiment. Dit houdt tevens in dat bij wisseling van een biologisch agens er niets meer merkbaar moet zijn van het vorige agens.
- Verschillende typen detectoren moeten eenvoudig kunnen worden aangesloten.

2 Verkregen resultaten in 2006

De werkzaamheden in 2006 hebben zich toegespitst op de volgende zaken:

- Het leren omgaan met de BAT-kamer.
- Validatie van de BAT-kamer.
- Het kunnen genereren van de standaard bio-simulanten in de gewenste concentraties.
- Standaard condities vinden om te komen tot standaard protocollen.
- Ervaring opdoen met het aansluiten en testen van meetapparatuur.

2.1 Bediening en validatie van de BAT-kamer

De werking van de BAT-kamer is in eerste instantie uitgelegd en gedemonstreerd door personeel van de leverancier Dycor. Tevens zijn twee afnametests uitgevoerd als onderdeel van de levering. Daarna zijn een serie experimenten uitgevoerd om de BAT-kamer te leren bedienen en te valideren. In het begin is gewerkt met uitsluitend 'silica', SiO₂ (Sigma S5631), een anorganisch molecuul, zonder aanwezigheid van een bio-agens. Het gebruikte SiO₂ heeft een grootte-verdeling van 0.5 µm tot 10 µm, met 80% tussen 1 - 5 µm. De Grimm 1.108 heeft een bereik van 0.3 - 20 µm en kan deze deeltjes dus goed detecteren. Met deze SiO₂ deeltjes is de goede werking van de BAT-kamer aangetoond, conform de specificaties. Zowel een statische als dynamische wolk zijn met succes gegenereerd. Daarmee werd tevens bereikt dat de basale bediening van de BAT-kamer duidelijk werd.

2.2 BG

Het eerste bio-agens dat gebruikt werd is BG (sporen van *Bacillus globigii*). Dit staat bekend als het meest eenvoudige simulant, voornamelijk vanwege de stabiliteit van de sporen, en is dus geschikt om mee te beginnen. Een suspensie van BG werd bereid door droge sporen (bron: Dugway Proving Ground, USA) te mengen met SiO₂ in water of PBS, in een bepaalde verhouding.

Voorlopig protocol BG

Een suspensie van silica wordt bereid door 100 mg SiO₂ (Sigma S5631) af te wegen en te suspenderen in 22.5 mL milliQ water.

Een stocksuspensie BG van 10 mg/mL wordt bereid door 800 mg BG sporen (Dugway, TNO-code BM341) in 8 mL milliQ water te suspenderen. Deze stocksuspensie wordt 1 op 10 doorverdund in milliQ water tot een concentratie van 1 mg/mL. Suspensies van 1 of 10 mg/mL zijn maandenlang houdbaar, mits bewaard bij 5 - 10 °C.

0.25 mL BG-suspensie (1 mg/mL) wordt aangevuld met 2.25 mL milliQ water en bovenstaande 22.5 mL SiO₂ suspensie, resulterend in 25 mL suspensie met de volgende concentraties:

- BG 0.01 mg/mL;
- SiO₂ 4 mg/mL.

Aangezien het gebruikte BG materiaal ongeveer $1.5 - 2.0 \times 10^8$ sporen per mg bevat geldt tevens:

- BG $1.5 - 2.0 \times 10^6$ sporen/mL in de uiteindelijk te vernevelen silica-BG suspensie.

De BG/SiO₂ suspensie wordt kort voor gebruik goed gemengd en ongeveer 15 mL wordt in een Hudson vernevelaar gegoten. De vernevelaar wordt aan een statief op ongeveer 80 cm hoogte in de BAT-kamer geplaatst.

Aangezien de gewichtsverhouding Silica : BG gelijk is aan 400 : 1, kan gesteld worden dat de Grimm 1.108 vrijwel uitsluitend Silica meet en daarop reguleert.

Een gebruikelijk Set Point voor de Grimm met bovenstaande suspensie is 600 (arbitraire eenheid).

De concentratie levende sporen in de suspensie in de vernevelaar wordt vooraf en na afloop van een experiment bepaald door een verdunningsreeks uit te platen op TSA platen en na overnacht bebroeden bij 37 °C het aantal kolonies te tellen. Dit resulteert in een concentratie uitgedrukt in cfu/mL en levert een controle op de gebruikte concentratie en inzicht in de stabiliteit van BG in de vernevelaar tijdens het experiment. Het gaat hier dus om de overleving in suspensie, niet om overleving in aerosol.

Gedurende de stabiele fase van de aerosol wordt op enkele tijdstippen (bijv. $t = 0, 30, 60, 90, 120$ minuten) een meting gedaan met beide, parallel aangesloten STA-samplers om de aerosol concentratie in ACPLA te meten. De STA-samplers worden standaard gebruikt met TSA platen, 30 L/min luchtafzuig en 360 ° draaiing in 2 minuten.

Resultaat BG

Het bereiken van een stabiele BG aerosol met Set Point 600 (Grimm) duurt ongeveer 5 - 15 minuten, en kan met een afwijking van $\pm 15\%$ gehandhaafd worden gedurende minstens 4 uur. Met de boven beschreven BG/Silica suspensie resulteert dit in een bio-aerosol met een concentratie van 30 - 50 ACPLA. De BG suspensie die in de Hudson vernevelaar achterblijft, blijkt volkomen stabiel te zijn gedurende 4 uur.

De levensvatbaarheid van de BG sporen lijdt dus niet onder de effecten die heersen in de vernevelaar. Alles wijst erop dat BG sporen ook in de aerosol fase stabiel zijn.

Door te variëren in de concentratie van de BG sporen in de suspensie en het gebruikte Set Point zijn verschillende bio-aerosol concentraties bereikt tussen 5 en 100 ACPLA. Het blijkt lastig om de ACPLA concentratie van te voren nauwkeurig (binnen een factor 2) in te schatten, op basis van de instellingen. Wel is gebleken dat binnen een experiment bijvoorbeeld een halvering van het setpoint resulteert in een halvering van de aerosol concentratie (met een afwijking van minder dan ca. 20%). Inter-experimenteel is de variatie vaak groter, tot ca. 100% (factor 2).

Figuur 17 toont een foto van een plaat uit een STA sampler, na bebroeden. Er zijn op deze plaat 339 kolonies geteld (339 CFU). Aangezien er 2 minuten bemonsterd is waarbij er 60 L lucht is aangezogen (30 L/min), betekent dit een aerosol concentratie van 6 ACPLA (339 / 60). De plaat wordt geteld per radiale sector (zie hoofdstuk 1.3), waarbij een sector 1/30 deel, ofwel 2 L lucht vertegenwoordigt. In dit voorbeeld (figuur 17) was het gemiddelde aantal CFU per sector 11.3 met een standaard deviatie (SD) van 3.9. Tijdens het gehele experiment werd viermaal bemonsterd met een STA sampler.

De verkregen waarden waren 339, 322, 314 en 323 CFU. Dit betekent een aerosol concentratie van respectievelijk 5.7, 5.4, 5.2 en 5.4 ACPLA. Het gemiddelde daarvan is 5.41 ACPLA (SD = 0.17).

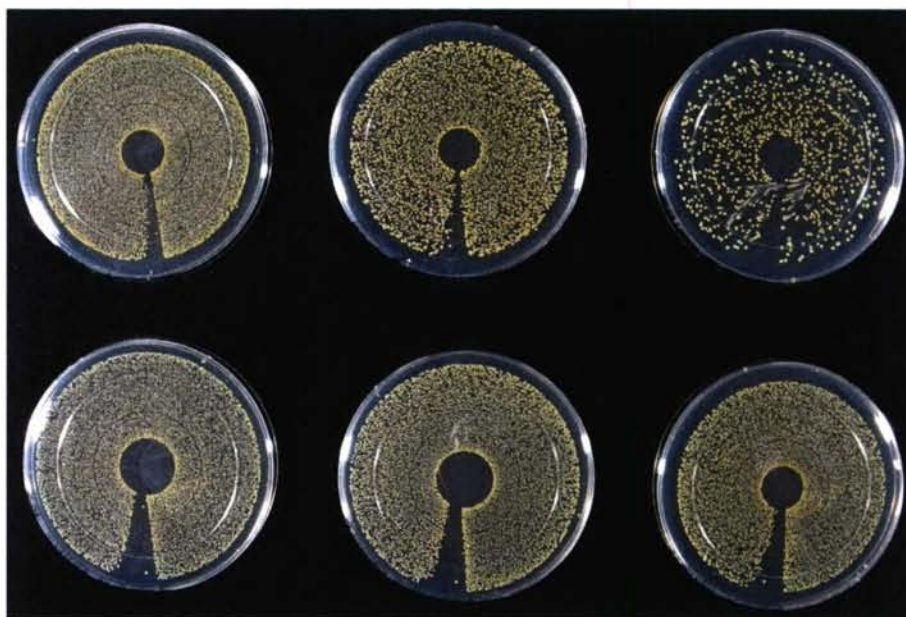


Figuur 17 Foto van een plaat uit een STA sampler, na bebroeden. Uit de berekening volgt een bio-aerosol concentratie van 6 ACPLA.

2.3 EH

Voor EH werd gebruik gemaakt van de stam die bekend staat als BM089 (TNO-code). Een andere geschikte stam is BM463 (ATCC33243). EH is een Gram-negatieve bacterie en is niet in staat tot het vormen van sporen, zoals BG. Verwacht werd dat dit organisme kwetsbaarder is en daarom mogelijk in de aerosol-fase en/of in de suspensie in de vernevelaar stabiliteitsproblemen zal vertonen. In de eerste experimenten werden gelijke condities gebruikt als voor BG. Dit resulteerde inderdaad in geringe stabiliteit, hetgeen bleek uit het feit dat binnen één uur na het begin van een experiment een forse daling in aerosol-concentratie werd waargenomen. Tevens bleek dat de concentratie levende cellen in de suspensie in de vernevelaar sterk achteruit ging tijdens een experiment. Dit bleek uiteindelijk oplosbaar door gebruik te maken van een ander type vernevelaar, een zogenaamde Collision. Hiermee bleef de aerosol concentratie gedurende twee uur stabiel (zie figuur 18).

In latere experimenten werd toch weer instabiliteit opgemerkt, althans bij lagere concentraties, zowel in de aerosol fase als in de suspensie in de vernevelaar. Dit werd opgelost door gebruik te maken van zogenaamd 'spent medium' (gebruikt medium). De suspensie van EH werd verdund tot de gewenste concentratie met behulp van kweekmedium waarin EH gekweekt was. Dit leverde weer stabiele aerosolen op.



Figuur 18 Agarplaten verkregen met STA samplers tijdens een experiment met EH. Bij de bovenste rij is een Hudson vernevelaar gebruikt, bij de onderste rij een Collision vernevelaar. Van links naar rechts zijn drie verschillende tijdstippen, respectievelijk 0, 60 en 120 minuten na aanvang experiment.

Voorlopig protocol EH

Een kweek van EH in BHI vloeibaar medium wordt op de middag voor de dag van het experiment ingezet, en overnacht gekweekt bij 37 °C en 250 rpm. De volgende ochtend wordt maximaal 20 mL kweek gebruikt, en aangevuld tot 80 mL met PBS. Indien een lagere concentratie is gewenst wordt een kleiner volume dan 20 mL kweek gebruikt. De rest van de kweek wordt afgedraaid bij 4000 rpm en het supernatant ('spent medium') wordt gebruikt om aan te vullen tot 20 mL. Daarbij wordt weer aangevuld tot 80 mL met PBS. De gemengde suspensie van 80 mL wordt in een Collision 3-jet vernevelaar gegoten. De vernevelaar wordt aan een statief op ongeveer 80 cm hoogte in de BAT-kamer geplaatst.

Voor EH wordt geen silica gebruikt. Dit is onnodig, omdat de componenten (zouten en eiwitten) van een kweek voldoende deeltjes geven voor monitoring door de Grimm 1.108. Tevens is gebleken dat een mengsuspensie van EH cellen in water met silica (zoals voor BG gedaan wordt), een zeer nadelig effect heeft op de stabiliteit van EH. Een gebruikelijk Set Point voor de Grimm met bovenstaande suspensie is 10000.

De concentratie levende EH cellen in de werksuspensie wordt vooraf en na afloop van een experiment bepaald door een verdunningsreeks uit te platen op TSA platen en na overnacht bebroeden bij 37 °C het aantal kolonies te tellen. Dit resulteert in een concentratie uitgedrukt in CFU/mL en levert een controle op de gebruikte concentratie en inzicht in de stabiliteit van EH in de vernevelaar tijdens het experiment.

Gedurende de stabiele fase (gemeten met de Grimm) van de aerosol wordt op enkele tijdstippen (bijv. $t = 0, 30, 60, 90, 120$ minuten) een meting gedaan met beide parallel aangesloten STA-samplers om de aerosol concentratie in ACPLA te meten. De STA-samplers worden standaard gebruikt met TSA platen, 30 L/min luchtafzuig en 360° draaiing in 2 minuten.

Resultaat EH

Het bereiken van een stabiele EH aerosol met Set Point 10000 (Grimm) duurt ongeveer 5 - 15 minuten, en kan met een afwijking van $\pm 15\%$ gehandhaafd worden gedurende minstens 4 uur. Met de boven beschreven EH suspensie resulteert dit in een bio-aerosol met een concentratie van 5 - 100 ACPLA. De EH suspensie in de Collison vernevelaar blijkt stabiel te zijn gedurende 4 uur.

2.4 MS2

Voor MS2 werd gebruik gemaakt van een stam die is gecodeerd met BM024 in de lokale TNO collectie. MS2 is een bacteriofaag (kortweg faag) van de bacterie *Escherichia coli* en moet dus gekweekt worden middels een infectieproces in een kweek van deze bacterie. In het supernatant van zo'n kweek bevinden zich de faagdeeltjes en dit wordt gebruikt als werksuspensie. Voor het infectieproces wordt *E. coli* stam XL1-blue (code BM088) gebruikt. Deze stam is eenvoudig commercieel verkrijgbaar, en heeft als praktisch voordeel dat de gevoeligheid voor faag-infectie gegarandeerd is doordat met tetracycline in het kweekmedium geselecteerd kan worden op aanwezigheid van de gevoeligheidsfactor voor infectie. Als kweekmedium wordt vloeibaar LB met tetracycline gebruikt.

Aangezien MS2 geen kolonies op een agar plaat kan vormen, moet ook het gebruik van de STA sampler anders worden opgezet. Hiervoor zijn verschillende mogelijkheden getest, maar uiteindelijk moet elke oplossing een manier hebben om zogenaamde plaques te tellen in een dichtgegroeide laag van *E. coli* bacteriën. Vanwege deze bijzondere manier van opvangen in een STA sampler, en vanwege het feit dat MS2 faagdeeltjes als kwetsbaar bekend staan, werd verwacht dat het niet eenvoudig zou zijn om een stabiele aerosol van MS2 te verkrijgen en dit betrouwbaar te meten met een STA sampler.

Er zijn drie variaties getest voor het meten van de MS2 aerosol met een STA sampler:

- 1 MS2 deeltjes worden opgevangen op een LB-agar plaat met daarop een top-agar waarin *E. coli* XL1-blue cellen, volgens standaard procedures (Sambrook et al. 1989). Na opvangen worden de platen direct overnacht bebroed bij 37 °C.
- 2 MS2 deeltjes worden opgevangen op een LB-agar plaat met daarop een top-agar zonder *E. coli* cellen. Na opvangen worden de platen overgoten met een top-agar waarin *E. coli* cellen. Daarna worden de platen overnacht bebroed bij 37 °C.
- 3 MS2 deeltjes worden opgevangen op een LB-agar plaat zonder een top-agar. Na opvangen worden de platen overgoten met een top-agar waarin *E. coli* cellen. Daarna worden de platen overnacht bebroed bij 37 °C.

De optimale manier van werken met STA samplers werd snel gevonden. Na overnacht broeden bij 37 °C waren duidelijke plaques zichtbaar. Methoden 1 en 2 bleken betrouwbare resultaten op te leveren. Bij methode 3 werden te lage ACPLA waarden gemeten. Aangezien methode 2 eenvoudiger is, werd deze als 'standaard' gekozen.

Voorlopig protocol MS2

- Vermeerdering van MS2 in een kweek van *E. coli* XL1-blue in LB medium, 37 °C en 150 rpm.
- Afdraaien 4000 rpm, faagconcentratie in supernatant bepalen middels standaard faagtitratie.

- Een faagverdunding van 10^8 pfu/mL in LB medium wordt gemaakt. Hiervan wordt 100 mL in een Collision vernevelaar gebracht.
- Een setpoint van 10000 voor de Grimm 1.108 wordt ingesteld.
- De STA samplers worden gebruikt met LB agar platen waarop een lege top-agar is aangebracht. Deze worden na de meting overgoten met een kweek van *E. coli* XL1-blue in de logaritmische fase in top-agar, volgens standaard faagprotocollen (Sambrook et al. 1989).
- Overnacht broeden bij 37 °C en tellen van de plaques.

Resultaat MS2

Op de hier beschreven wijze werden reproduceerbaar stabiele aerosolen verkregen van 5 - 100 ACPLA, vergelijkbaar met BG en EH.

2.5 Randapparatuur

Er is tevens geëxperimenteerd met aansluiten van randapparatuur. Hiervoor is een UV-APS gebruikt, in combinatie met een virtuele impactor. Hierbij moesten aanpassingen worden gemaakt om de randapparatuur aan te sluiten op de aanwezige connectiepoorten van de BAT-kamer. Deze randapparatuur werd gebruikt met een aerosol van BG sporen van ca. 50 ACPLA. De UV-APS bleek op zichzelf niet gevoelig genoeg voor deze concentratie. Met gebruik van de impactor werd wel wat gemeten, maar de resultaten waren niet reproduceerbaar en niet duidelijk interpreteerbaar omdat op de rand van de detectiegrens werd gemeten. Hieruit konden geen zinvolle conclusies worden getrokken.

3 Discussie en vervolg

Van de vier simulanten (BG, EH, MS2, OV) zijn drie (BG, EH, MS2) met succes afgerond. OV is wegens tijdgebrek niet uitgevoerd en staat op het programma voor 2007.

BG

Zoals verwacht bleek BG de eenvoudigste van de geteste simulanten. Desondanks is hier veel mee geëxperimenteerd, omdat dit handig was om de BAT-kamer goed te leren kennen. Met BG zijn dus veel data verkregen, en dat is nuttig als referentie bij toekomstige experimenten. Met BG is een werkbaar protocol verkregen en zijn concentraties van 5 - 100 ACPLA reproduceerbaar te bereiken, alhoewel het enigszins moeilijk is van tevoren een gewenste concentratie goed in te schatten (binnen een factor 2). Bij hogere concentraties (bijv. 100 ACPLA) is het tellen van de kolonies (CFU's) met het oog bijna onmogelijk. Op een STA plaat zouden dan 6000 kolonies zitten, ofwel 200 CFU per sector. Hiervoor is een camera met software noodzakelijk. Het is niet mogelijk de STA sampler anders in te stellen om dit te ondervangen. Dit kortste draaitijd is 2 minuten (langer kan wel).

EH

EH bleek aanvankelijk instabiel, maar dit leek opgelost te zijn door gebruik te maken van een Collison vernevelaar. Daarna werd toch weer instabiliteit opgemerkt. Ook dit werd weer opgelost door gebruik te maken van zogenaamd 'spent medium' (gebruikt medium). Hiervan gaat kennelijk een beschermende werking uit. Met dit protocol werden enige tijd goede resultaten bereikt.

Dit ging lange tijd goed, totdat in januari 2007 EH weer problemen gaf. Dit keer bleek het niet om instabiliteit in de suspensie in de vernevelaar te gaan, maar om instabiliteit in de aerosol fase. EH bleek binnen 1 minuut in aerosol fase af te sterven. De EH suspensie in de Collison vernevelaar blijkt echter volkomen stabiel te zijn gedurende 4 uur. De levensvatbaarheid van de EH cellen gaat dus niet achteruit tijdens het verblijf in de vernevelaar, maar wel zodra het in de aerosol fase komt. Dit probleem zal in 2007 moeten worden aangepakt. Hiervoor zijn verschillende ideeën geopperd, waarover later gerapporteerd zal worden.

MS2

Van MS2 werd verwacht dat deze wellicht problemen zou geven in de vorm van instabiliteit, en tevens werd verwacht dat het niet eenvoudig zou zijn om een methode te vinden voor het meten van de aerosol concentratie met STA samplers. Dit bleek bijzonder mee te vallen. Er is geen probleem met instabiliteit opgetreden en een meet-methode met de STA samplers werd snel gevonden.

Randapparatuur

Buiten de geteste randapparatuur was in 2006 niet veel alternatief beschikbaar. De gebruikte UV-APS bleek niet gevoelig genoeg zonder impactor, en met impactor werden geen duidelijke resultaten verkregen. In 2007 zal verder worden getest met randapparatuur. Tevens zal een camera met software voor het tellen van kolonies in gebruik worden genomen.

Plannen voor 2007

Ten eerste zal gewerkt moeten worden aan het verbeteren van de stabiliteit van EH, die toch nog onvoldoende blijkt te zijn. Hiervoor wordt intensief overlegd met de firma Dycor en andere bekende partijen over parameters, gebruikte stammen, kwaliteitscontrole en alle andere zinvolle suggesties.

Daarnaast zal Ovalbumine (OV) moeten worden getest om met alle vier standaard simulanten te kunnen werken.

Voor januari 2007 is een bezoek afgesproken van twee medewerkers van de Noorse Defensie research FFI. Tijdens het bezoek zal de SASS2000 airsampler van FFI worden getest. De Noren hebben al enige ervaring met deze airsampler in veldtesten, maar nog niet met gecontroleerde aerosolen in een kamer.

In 2007 wordt ook een test voorzien met de mobiele opstelling van het Bio Aerosol Alarm (BAA) apparaat.

Indien haalbaar, zullen experimenten worden uitgevoerd met een mobiele dieselmotor, als model voor een niet biologische achtergrond.

Indien haalbaar zullen enkele andere bio-simulanten worden getest. In aanmerking komen *Bacillus thuringiensis* (BT), Baculovirus, en *E. coli*.

4 Referenties en websites

Broekhuijsen M.P.; Polhuijs M.; Tuinman I.L. en Gerritse K. (2002),
*Ontwikkeling van faciliteiten en methoden ten behoeve van de evaluatie van
apparatuur voor B-detectie*,
TNO PML rapport 2002-A84.

Kievit O.; Tuinman I.L.; Groeneveld F.R. en Vanwersch W.E..M. (2004),
Bioaërosol testfaciliteiten - Inventarisatie van wensen en eisen, kosten en kansen,
TNO-rapport PML 2004-IN10.

Sambrook J.; Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989),
Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed);
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Wolterink A.F.W.M.; Tuinman I.L. en Kievit O. (2006),
Bioaërosol testfaciliteiten: van idee tot realisatie,
TNO-rapport TNO-DV2 2006 IN005.

<http://www.dycor.com>
De website van Dycor Technologies, Canada.

<http://www.dustmonitor.com/Occupational/1108.htm>
De Grimm particle sizer model 1.108.

<http://www.nbsc.com/airsamp.aspx>
De STA samplers van New Brunswick Scientific.


5 Ondertekening

Rijswijk, juli 2007

TNO Defensie en Veiligheid

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F.J. Bikker', with a large, sweeping initial 'B'.

dr. F.J. Bikker
Projectleider

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M.P. Broekhuijsen', with a complex, stylized initial 'M'.

ir. M.P. Broekhuijsen
Auteur

REPORT DOCUMENTATION PAGE
(MOD-NL)

1. DEFENCE REPORT NO (MOD-NL) TD2007-0143	2. RECIPIENT'S ACCESSION NO	3. PERFORMING ORGANIZATION REPORT NO TNO-DV 2007 A297
4. PROJECT/TASK/WORK UNIT NO 014.17750	5. CONTRACT NO -	6. REPORT DATE July 2007
7. NUMBER OF PAGES 32 (excl RDP & distribution list)	8. NUMBER OF REFERENCES 7	9. TYPE OF REPORT AND DATES COVERED Final
10. TITLE AND SUBTITLE Bio-Aërosol Testkamer: Ontwikkeling van protocollen Bio Aërosol Test chamber: Development of protocols		
11. AUTHOR(S) M.P. Broekhuijsen, MSc.		
12. PERFORMING ORGANIZATION NAME(S) AND ADDRESS(ES) TNO Defence, Security and Safety, P.O. Box 45, 2280 AA Rijswijk, The Netherlands Lange Kleiweg 137, Rijswijk, The Netherlands		
13. SPONSORING AGENCY NAME(S) AND ADDRESS(ES)		
14. SUPPLEMENTARY NOTES The classification designation Ongerubriceerd is equivalent to Unclassified, Stg. Confidentieel is equivalent to Confidential and Stg. Geheim is equivalent to Secret..		
15. ABSTRACT (MAXIMUM 200 WORDS (1044 BYTE)) A newly installed test chamber for bio-aërosols was evaluated using three different simulants for biological warfare agents. The three simulants were <i>Bacillus globigii</i> (spores), <i>Erwinia herbicola</i> , and MS2 virus. With all three, aërosols in the range of 5-100 ACPLA were generated and maintained for up to 6 hours.		
16. DESCRIPTORS Bio Aërosol Test chamber, standard protocols		IDENTIFIERS Bio simulants, aërosols
17a.SECURITY CLASSIFICATION (OF REPORT) Ongerubriceerd	17b.SECURITY CLASSIFICATION (OF PAGE) Ongerubriceerd	17c.SECURITY CLASSIFICATION (OF ABSTRACT) Ongerubriceerd
18. DISTRIBUTION AVAILABILITY STATEMENT Unlimited Distribution		17d.SECURITY CLASSIFICATION (OF TITLES) Ongerubriceerd

Distributielijst

Onderstaande instanties/personen ontvangen een volledig exemplaar van het rapport.

- 1 BS/AL/DMO/SC-DR&D
standaard inclusief digitale versie bijgeleverd op cd-rom
- 2/3 BS/AL/DMO/DR&D/Kennistransfer
- 4 BS/AL/DMO/Directie Beleid/DR&D/Cluster 2
KTZE J. Wind
- 5 Programmabegeleider V502
BS/HDP/DMG
KTZAR M.J.W. Neuteboom
- 6 BS/AL/DMO/Directie Beleid/DR&D/Cluster 2
KLTZE ir. W.W. Schalkoort
- 7 BS/AL/DMO/Directie Beleid/DR&D/Cluster 2
LTZSD2 ir. N.G. Pullen
- 8 BS/HDP/DMG
Cdre A.J. van Leusden, Directeur Militaire Gezondheidszorg
- 9 CDC/BGGZ/CEMG
Kol-arts H.A. Gerretsen MPH
- 10 CDC/BGGZ/CEMG
A.S. de Koning, arts
standaard inclusief digitale versie bijgeleverd op cd-rom
- 11/12 DMIVD, Kabinet
- 13 Militaire Inlichtingen- en Veiligheidsdienst
Drs. W. van Haren
- 14 BS/AL/CDS/D-OBBP/Res. Behoef/Afd. Gem. Be/Si
Maj. B. Doesburg-Smits
- 15 C-JKC NBC,
Ltkol C.A. Bourgondiën
standaard inclusief digitale versie bijgeleverd op cd-rom
- 16 BS/AL/CDS/D-OBBP/Res. OB/Afd. OpBel/Sectie A
LtKol M. Grisnigt
- 17 BS/AL/CDS/D-OBBP/Res. OB/Afd. OpBel/Sectie A
LtKol B.S.P. Kamstra
- 18 DMO/DWS&B/Landsystemen/LOG systemen/COGP
Kol ir. M.B.G. Mulder
- 19 BS/AL/CDS/D-OBBP/Res. OB/Afd. OpBel./Sectie A
Maj H. Boom
- 20 C-JNBC School
Maj M.J.M. Donkers
- 21 H.G.B. Reulink
LBBKL/KPU-bedrijf

- 22 DMO/DWS&B/Landsystemen/LOG systemen/NBC+GNK materiaal
Ir. A.A.M. Slagveer
- 23/25 Bibliotheek KMA
- 26 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Programmaleider V502
dr. R.W. Busker
- 27 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Manager BC Bescherming (operaties), ir. R.J.A. Kersten
- 28 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Business Unit BC Bescherming,
Dr. J.P. Langenberg
- 29 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Business Unit BC Bescherming,
D. van de Meent
- 30 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Business Unit BC Bescherming,
A.L. van der Laaken
- 31 TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk,
Business Unit BC Bescherming,
O. Kievit

Onderstaande instanties/personen ontvangen het managementuittreksel en de distributielijst van het rapport.

4 ex.	BS/AL/DMO/SC-DR&D
1 ex.	DMO/ressort Zeesystemen
1 ex.	DMO/ressort Landsystemen
1 ex.	DMO/ressort Luchtsystemen
2 ex.	BS/DS/D-OBBP/SCOB
1 ex.	MIVD/AAR/BMT
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, Algemeen Directeur, ir. P.A.O.G. Korting
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, Directie Directeur Operaties, ir. C. Eberwijn
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, Directie Directeur Kennis, prof. dr. P. Werkhoven
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, Directie Directeur Markt, G.D. Klein Baltink
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Den Haag, Manager Waarnemingssystemen (operaties), ir. B. Dunnebier
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Den Haag, Manager Informatie en Operaties (operaties), ir. P. Schulein
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Rijswijk, Manager Bescherming, Munitie en Wapens (operaties), ir. P.J.M. Elands
1 ex.	TNO Defensie en Veiligheid, vestiging Soesterberg, Manager Human Factors (operaties), drs. H.J. Vink
1 ex.	Ltkol H. Evertse BS/AL/CDS/IMS/Afd. Navo-WEU/Stafofficier, nucleaire en non-proliferatiezaken
1 ex.	D.M. van Weel BS/AL/HDAB
1 ex.	Drs. E.S.A. Brands BS/DJZ/IJB
1 ex.	Ltkol A. Solkesz HDP/DPB
1 ex.	Maj R.F.M. Schröder Las/PBDL/OB